

Capítulo 5 Fotosensibilización como herramienta para la remoción de coliformes totales en agua

Chapter 5 Photosensitization as a tool for the removal of total coliform in water

GARCÍA-LARA, Carlos Manuel†*, NÁJERA-AGUILAR Hugo Alejandro, MARTÍNEZ-SALINAS, Rebeca Isabel y VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, Rubén Alejandro

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Ambiental. Libramiento Norte Poniente 1150, colonia Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

ID 1^{er} Autor: *Carlos Manuel, García-Lara* / **ORC ID:** 0000-0001-5860-266X, **CVU CONACYT ID:** 201783

ID 1^{er} Coautor: *Hugo Alejandro, Nájera-Aguilar* / **ORC ID:** 0000-0002-9337-8242, **CVU CONACYT ID:** 83503

ID 2^{do} Coautor: *Rebeca Isabel, Martínez-Salinas* / **ORC ID:** 0000-0002-2459-1090, **CVU CONACYT ID:** 162919

ID 3^{er} Coautor: *Rubén Alejandro, Vázquez-Sánchez* / **CVU CONACYT ID:** 90602

DOI: 10.35429/H.2021.16.39.47

C. García, H. Nájera, R. Martínez y R. Vázquez

* carlos.garcia@unicach.mx

S. Figueroa (AA.). Aplicaciones Láser en la Ingeniería. Handbooks-TI-©ECORFAN-Mexico, 2021.

Resumen

En este capítulo se trataron muestras de agua contaminadas con diferentes microorganismos. Para el caso de agua contaminada con *Escherichia coli* ATCC 25922, se obtuvo la inhibición de esta al adicionarle azul de metileno, este resultado fue evaluado para diferentes condiciones de iluminación y presencia de colorante. Para una muestra de agua contaminada con 1×10^6 UFC mL⁻¹ de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), evaluada con tres concentraciones diferentes de azul de metileno (0.85, 0.95 y 1.05 Mm) en presencia y ausencia de radiación solar, se determinó una remoción a la salida de 1×10^3 UFC mL⁻¹ en promedio, para la concentración de 1.05 Mm. Por último, se evaluó agua proveniente de una planta de bombeo con alto contenido de coliformes totales, 242 UFC mL⁻¹, mediante la adición de azul de metileno en una primera instancia y añil en otra, obteniéndose eficiencias de remoción de 93.05% y 85.41% respectivamente.

Foto sensibilización; Oxígeno Singlete, Azul de metileno

Abstract

In this chapter water samples contaminated with different microorganisms were treated. For the case of water contaminated with *Escherichia coli* ATCC 25922, the inhibition of this was obtained by the addition of methylene blue, this result was evaluated for different lighting conditions and presence of dye. For a sample of water contaminated with 1×10^6 CFU ml⁻¹ of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), evaluated with three different concentrations of methylene blue (0.85, 0.95 and 1.05 Mm) in the presence and absence of solar radiation, an output removal of 1×10^3 CFU ml⁻¹ on average was founded with 1.05 Mm concentration. Finally, water from a pumping plant with a high content of total coliforms, 242 ml⁻¹ of UFC, was evaluated by adding methylene blue in one first instance and indigo in another, obtaining removal efficiencies of 93.05% and 85.41 % respectively.

Photosensitization, Singlet oxygen, Methylene blue

Introducción

El proceso de fotosensibilización se produce al generar, por absorción de la luz a una longitud de onda determinada, el estado excitado de las moléculas de un colorante llamado sensibilizador. La excitación electrónica del fotosensibilizador en presencia de oxígeno implica la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (De Paula et al., 2010). El fotosensibilizador se regenera de manera que actúa como una especie de catalizador, formando a partir de una sola molécula de éste muchas moléculas de oxígeno singlete, tantas veces como el oxígeno y la luz molecular están presentes (Sabbahi et al., 2010).

Entre los fotosensibilizadores más comúnmente utilizados para la generación de oxígeno singlete están la rosa de bengala, azul de metileno, porfirina, entre otros (García, 2010); los fotosensibilizadores pueden iniciar una reacción fotoquímica Tipo I o Tipo II o una combinación de ambos. Las reacciones de tipo I implican la transferencia de electrones o protones desde el estado triplete del fotosensibilizador, lo que lleva a la formación de especies citotóxicas como los radicales superóxido, hidroxilo e hidroperóxido (Hasegawa et al., 2015). En una reacción de Tipo II, se produce una transferencia de energía al estado fundamental del oxígeno molecular, lo que conduce a la producción del oxígeno reactivo singlete (Sabbahi et al., 2010).

De acuerdo con García (2010), entre las aplicaciones más recientes del oxígeno singlete está el desarrollo de procesos de desinfección de aguas, ya que este es susceptible de reaccionar con biomoléculas presentes en la pared celular de microorganismos (los lípidos y proteínas de membrana), lo que conduciría a su inactivación. La inactivación fotodinámica (PDI) es el nombre de un proceso, derivado de la terapia fotodinámica (De Paula et al., 2010); el cual consiste en que un fotosensibilizador es absorbido favorablemente por las bacterias y posteriormente activado por la luz a una longitud de onda específica en presencia de oxígeno reactivo citotóxico, que son tóxicos a especies bacterianas (Fekrazad et al., 2016).

Debido a la inmovilización del fotosensibilizador en el medio pueden ocurrir cambios espectrales que afecten la absorción de luz, generando menos estados excitados y un tiempo de vida del estado excitado corto, por lo que el proceso de transferencia de energía al oxígeno molecular será menos eficiente y, como consecuencia, el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singulete será menor que el determinado para el sensibilizador, por otro lado si el oxígeno singulete generado reacciona eficientemente con especies químicas presentes en el medio, llegará un momento en que la concentración de oxígeno molecular en el mismo se agote, por lo que la producción de oxígeno singulete cesa, debido a esto es importante que exista una aireación o reposición del oxígeno. Si la concentración del fotosensibilizador en el medio es muy grande, puede ocasionar que el oxígeno singulete generado sea desactivado por colisiones con el mismo fotosensibilizador que lo está produciendo, lo que disminuye apreciablemente el rendimiento cuántico de producción de oxígeno singulete.

Fotosensibilizadores en tratamiento de aguas

En estudios aplicados en la desinfección del agua, autores como Orellana et al. (2011), utilizaron azul de metileno (AM), logrando con éxito a escala de laboratorio y en una planta piloto experimental, tras 35 min de irradiación solar (0.84 kW/m^2) a efluentes contaminados con *Escherichia coli*, una disminución de la población microbiana de 4 a 5 órdenes de magnitud. Por otra parte, los autores Sabbahi, Alouini, Ben Ayed, (2010) realizaron un estudio utilizando muestras de efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Charguia, evaluando mediante el método de Número Más Probable (NMP) la presencia de Coliformes termo tolerantes y *E. coli*. Para la inactivación de bacterias, utilizaron una lámpara 500 watts, tipo halógeno (OSRAM) a 650 nm como fuente de luz, concentraciones de AM desde 5 a 70 μM . Como resultado obtuvieron que a partir de 20 μM de AM se lograba la inactivación de bacterias. Asimismo, después de 2 h, utilizando una concentración de 50 μM de AM, las muestras presentaron una reducción $>99\%$ de Coliformes termo tolerantes. Los autores concluyen, que utilizando una concentración de 10 μM seguido de una exposición de 12 horas de luz solar, se puede foto blanquear AM, presentando una eficiencia del 92%.

Asimismo, otro estudio denominado Inactivación fotodinámica de *Escherichia coli* con AM y verde malaquita bajo luz LED roja, Hasegawa, et al. (2015), prepararon una suspensión estándar de *E. coli* (ATCC 25922) que contenía 106 UFC mL^{-1} (Unidades Formadores de Colonias) y con los fotosensibilizadores mencionados, irradiaron a longitudes de onda entre 600 y 680 nm, utilizando una concentración de 1000 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ de AM, redujeron el 94.6% de *E. coli*, en contraste con un 90% con el verde malaquita; ambos tras 15 minutos de exposición de irradiación.

Además (De Paula et al., 2010), en su trabajo, un estudio comparativo de los sistemas de irradiación para la foto inactivación de microorganismos. Utilizaron tres fuentes de radiación diferentes, AMS-II (652 nm), LED600 (663 nm) y una lámpara halógena (OSRAM, modelo ENH, 250 W a 675-700 nm), en una cepa que corresponde a *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923). Prepararon soluciones de AM, a concentraciones de 5×10^{-5} , 5×10^{-6} y $5 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$. Irradiaron las muestras de agua durante 20 minutos. La primera fuente de radiación presentó una foto inactivación superior al 99%. Los otros equipos que utilizaron para irradiar también presentaron buenos resultados de foto inactivación, siendo que a la concentración de $5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ no hubo formación de colonias.

Otro ejemplo, son Orellana et al. (2011), en una planta piloto experimental, como agente sensibilizador el autor utilizó una concentración de 0.7 g/m^3 de AM, a una iluminación de $0.28\text{--}0.84 \text{ kW/m}^2$, el tratamiento duró 35 min en el cual removieron Coliformes y *E. coli*, *Enterococcus fecalis*, polivirus, con 4 horas de irradiación solar la degradación del agente fotosensibilizador se aproximó al 100%. En un estudio realizado por Rossel et al., (2020), el cual consistió en la desinfección de un influente con Coliformes totales y termo tolerantes con 200 UFC/100 ml, utilizando radiación ultravioleta durante 4 segundos de exposición, eliminando por completo estos microorganismos. Otra investigación hecha por los autores Sabbahi et al. (2010), utilizando un influente con 1.1×10^4 de Coliformes totales, logrando eliminar el 99% de estos. utilizando una concentración de 50 μM de AM a 2 horas de exposición a la luz. Un estudio similar es el de Gutiérrez et al. (2006), el autor evaluó el tiempo de inactivación de Coliformes totales y fecales utilizando una concentración 0.5011 mg/ml de Dióxido de Titanio (TiO_2), con exposición a radiación solar de 120 minutos, la muestra tenía 3500 NMP/100 ml de coliformes totales, alcanzando una inactivación del 100%. Respecto a los Coliformes termo tolerantes, la radiación es mucho más importante que la temperatura, puesto que estas bacterias resisten incrementos alrededor de 50°C sin causar mortalidades apreciables (Solarte et al., 1997).

En este proyecto se realizaron tres diferentes arreglos experimentales. Caso 1. *E. coli* ATCC 25922 depositadas en cajas Petri y azul de metileno como agente fotosensibilizador, Caso 2. *E. coli* enteropatógena (EPEC) depositado en agua esterilizada, tratada con azul de metileno en el tren de tratamiento. Caso 3. Agua proveniente del río Grijalva con contenido de Coliformes totales y tratada con azul de metileno y añil como agentes fotosensibilizadores en el tren de tratamiento.

Materiales y métodos

Los colorantes utilizados fueron el azul de metileno o Cloruro de Metiltionina, es un colorante derivado de la fenotiazina, capaz de enlazarse con ácidos nucleicos, es utilizado en terapia fotodinámica de tumores malignos. Se encuentra como cristales de color verde oscuro que tienen la particularidad de ser muy soluble en agua y al hacerlo, la solución se torna color azul. Su fórmula molecular es $C_{16}H_{18}N_3SCl$ y el añil, *Indigofera suffruticosa*, esta especie produce el colorante, que es propio de tierras tropicales, mide aproximadamente un metro y pertenece al grupo de leguminosas (Contreras, 2010). El índigo de origen vegetal está compuesto por indigotina y una serie de componentes minoritarios, como indirubina, flavonoides, sales inorgánicas, entre otros (Castañeda, 2019). En México, el colorante se obtiene de dos especies de arbustos, y aunque la más importante de ellas también tiene aplicaciones medicinales, alimenticias y cosmetológicas, el uso más conocido y tradicional es el tintóreo (Martínez, 2014). Sin embargo, otras especies de añil se han utilizado en otros países. En este sentido, Ariizumi, manifiesta que los textiles teñidos con índigo tienen actividad bactericida (Citado por Sandoval et al., 2006). Actualmente, se cultiva localmente en algunas partes de la región del Istmo de Tehuantepec en Oaxaca y su importancia ha aumentado ligeramente en los últimos años por la demanda de colorantes naturales (Hanan & Mondragón, 2009).

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. La absorbancia (A) está relacionada con la muestra, puesto que indica la cantidad de luz absorbida por la misma, se define como el logaritmo de I_0/I_T , en consecuencia:

$$A = -\log\left(\frac{I_T}{I_0}\right) \quad (1)$$

Cuando la intensidad incidente (I_0) y transmitida (I_T) son iguales, la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale $\log 1 = 0$. La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que recorre está a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste, expresada en la ley de Beer-Lambert

$$A = \epsilon c l \quad (2)$$

La cual cumple para soluciones diluidas a concentraciones altas c , la constante de proporcionalidad ϵ varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, adición de moléculas, cambios del medio, etc. y a una longitud l de desplazamiento a través del material. El pico de absorción de una solución indica la región en la cual esta obtiene una mayor transferencia de energía de los fotones a sus moléculas. Para el azul de metileno se tiene una máxima absorción a una longitud de onda alrededor de los 660 nm, en la región naranja/rojo del espectro UV-Vis, por lo cual es preciso irradiar con una fuente de luz con pico de emisión presente en esta región.

Para la preparación de la dilución del colorante se realizaron los siguientes pasos, en una balanza analítica se midieron los gramos de colorante (solute) necesarios para las concentraciones deseadas, se depositó en un vaso de precipitado y se le agregó agua destilada, a un volumen determinado para alcanzar la concentración deseada y por último, se homogenizó la solución y se almacenó en un recipiente de color ámbar bajo refrigeración. La muestra es viable de 2 a 3 meses en esas condiciones.

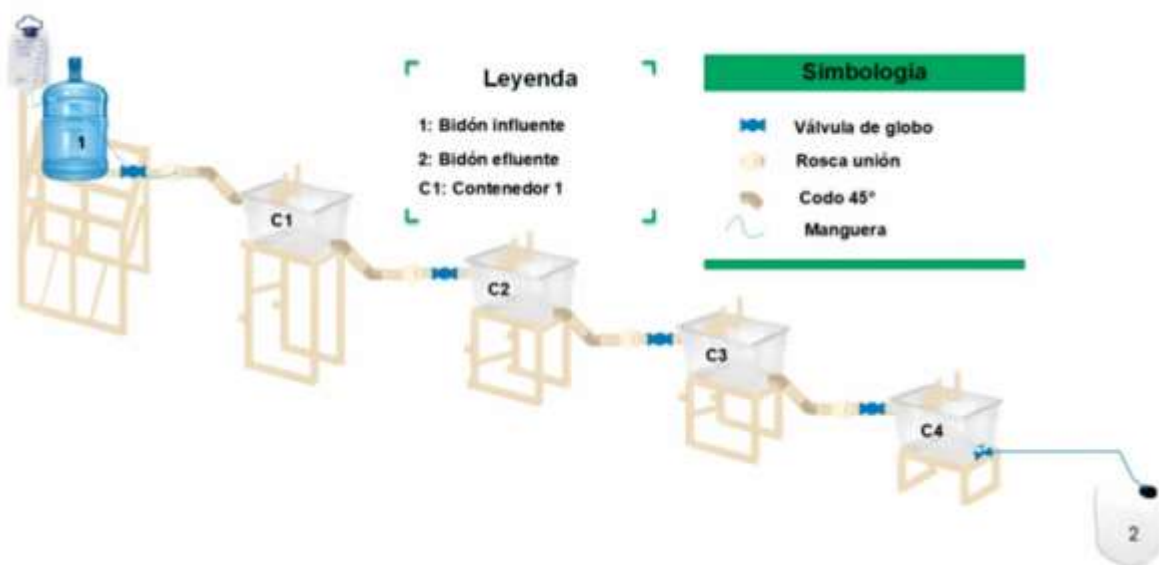
Inactivación de coliformes totales y bacterias

Para evaluar la efectividad de inactivación empleando el azul de metileno o añil como agente fotosensibilizador, se observaron las siguientes condiciones, como fuente de iluminación para la excitación del colorante se empleó la luz solar, debido a que es capaz de generar la fotosensibilización (Cooper & Goswami , 2002), por el amplio espectro que presenta, además de ser una fuente natural, limpia, y con la capacidad de aportar altas cantidades de energía en poco tiempo; se utilizaron concentraciones de colorante desde 0.85 mM; se expuso la muestra desde 25 minutos hasta 75 minutos de irradiación solar y para corroborar el efecto de inactivación se realizó el conteo de bacterias del influente y efluente. Las alícuotas tomadas para cada repetición fue empleando un Asa bacteriológica calibrada de 10 uL según las especificaciones de producción.

Tren de tratamiento

Orellana (2005) realizó el experimento de foto inactivación mediada por O₂, en una planta piloto experimental, que consistía en un tren de tratamiento con material de acero galvanizado, en este trabajo se utilizó una estructura asequeble en términos de costo y disponibilidad de materiales, se construyó con tubos de CPVC de media pulgada de diámetro, que funcionó como la base del sistema.

Figura 1. Tren de tratamiento utilizado con dosificador de colorante y control de tiempo de retención hidráulico



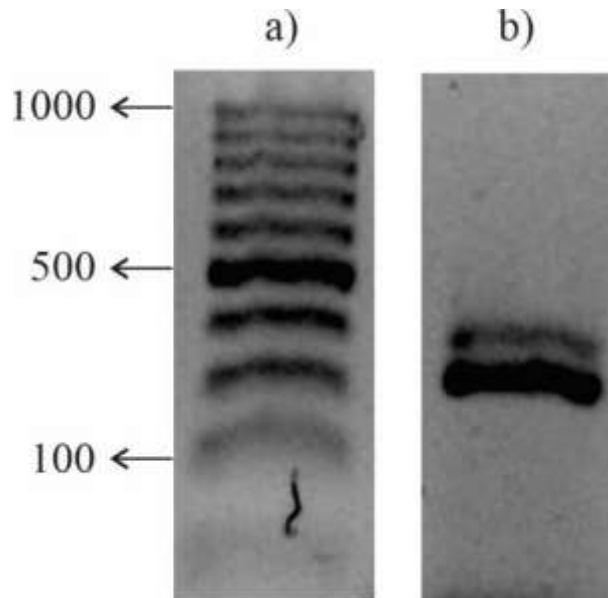
En la figura 1 se muestra el diagrama del tren de tratamiento. El arreglo tiene como entrada un bidón (1) con una capacidad de 19 litros, que funcionó como almacenamiento para el influente; seguido de cuatro contenedores, con capacidad de almacenar un volumen de 3.5 litros cada uno, conectados entre sí con tubos de CPVC de media pulgada. Para regular el caudal se utilizaron cuatro válvulas de globo de ½ pulgada; se colocaron a partir del bidón 1 y Contenedor 1 (C1), y entre cada unión de contenedores (C1, C2, C3 y C4). Para la salida del agua del último contenedor se utilizó un micro gotero conectado a una manguera con equipo para venoclisis, mismo que se encargó de conducir el agua hasta el bidón de salida (2), el cual se utilizó como almacenamiento del agua tratada. Para el colorante se colocó una bolsa para enema (Industrias Plásticas Médicas, IPM) con una capacidad de 1000 ml conectada al tren de tratamiento, lo cual permitió su dilución con el agua.

Características genotípicas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

La *Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia Enterobacteriaceae de la tribu *Escherichia* (Bergey, 1994). Entre algunos de sus múltiples atributos se sabe que es el principal anaerobio facultativo de la flora normal microbiana del colon humano, en donde participa de manera importante en el control fisiológico. Típicamente *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos dentro de sus primeras horas y permanece ahí durante toda la vida en simbiosis con su huésped humano (Vidal-Graniel, 2003).

La EPEC, denominada así para diferenciar a este tipo virulento de las bacterias de flora normal, es una bacteria causante principal de diarrea en niños menores de dos años en países en vías de desarrollo. La principal característica histopatológica de la infección es una lesión que induce la EPEC en el intestino conocida como la lesión A/E (adherencia y eliminación).

Figura 2 Genes *eaeA* y *bfpA* (384 y 324 pares de bases [pb], respectivamente) de *E. coli* enteropatógena (EPEC) amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa. a) MPM (100 pb); b), genes *eaeA* y *bfpA* en la cepa prototipo *E. coli* enteropatógena E2348/69



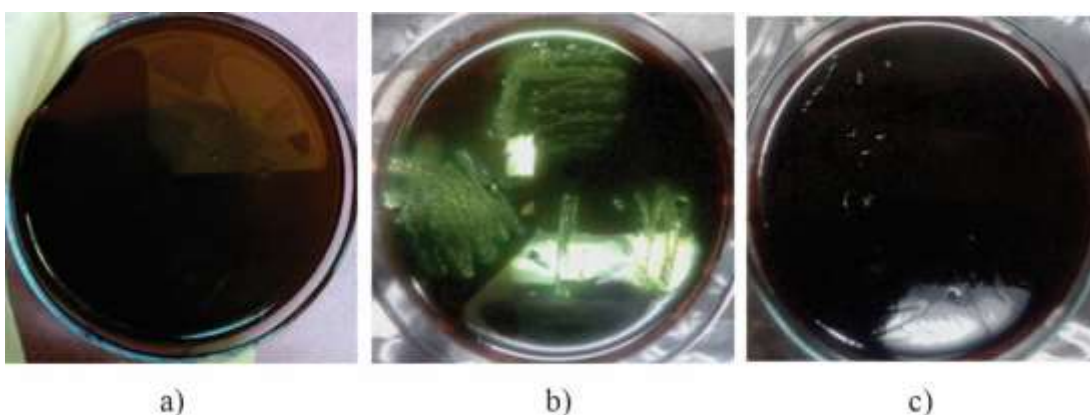
En la figura 2 se aprecian los genes que distinguen a la bacteria utilizada para los ensayos, *eaeA* y *bfpA* (384 y 324 pares de bases, respectivamente), que codifican para las proteínas intimina y pili formador de rizos de esta bacteria. Ambas proteínas tienen papeles relevantes para que esta bacteria cause daño al intestino humano y de animales. Este reconocimiento se realizó mediante el análisis genético, donde se encuentran estos dos genes típicos (cada banda representa a un gen).

Resultados

Caso 1. Fotosensibilización para la remoción de *Escherichia coli* ATCC 25922

Se realizaron ensayos en cajas de Petri, utilizando un asa de 10 uL con la alícuota la cual se depositaron muestras en un agar estándar Luria Bertani (LB), se utilizó este agar ya que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, entre estos, la cepa de *E. coli* ATCC 25922 utilizada en el ensayo, colocando muestras en completa oscuridad (grupo testigo), muestras irradiadas con luz solar (grupo de control) y muestras con azul de metileno (AM) expuestas de igual manera a luz solar (grupo experimental) para observar el efecto de fotosensibilización del AM sobre las bacterias.

Figura 3 Imágenes de los resultados observados sobre los ensayos realizados: a) (grupo testigo), b) grupo de control y c) grupo experimental



En la figura 3, se presentan imágenes siendo a) muestras del grupo testigo, como se esperaba, no presentaron inactivación. Lo que realza el hecho de la necesidad de una fuente de luz para activar el efecto de fotosensibilización, b) sobre el grupo de control, se realizaron ensayos con irradiación solar de 1 minuto, observando crecimiento bacteriano lo que demuestra la ausencia de efecto de oxidación generado por el fotosensibilizador y c) para el grupo experimental, se observó ausencia de crecimiento, con esto se infiere que un minuto de exposición solar es suficiente para llevar a cabo el proceso de fotosensibilización del AM sobre las muestras.

Caso 2. Fotosensibilización para la remoción de *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Se utilizó el tren de tratamiento descrito en la figura 1, empleando ensayos de 10 litros de agua esterilizada a la cual se le agregaron 1×10^6 unidades de EPEC y mediante un dosificador se agregaron dosis desde 0.85 hasta 1.05Mm de azul de metileno, exponiéndose a la luz solar durante 25 minutos. Luego de tratar el agua contaminada con *E. coli* enteropatógena con azul de metileno, divididas en muestras expuestas a la luz solar (R) y no expuestas a está (SR), se observó una reducción significativa en la cantidad de Unidades formadoras de colonias (UFC) de esta bacteria (Tabla 1). En la Tabla 1, muestra la cantidad de *E. coli* enteropatógena (UFC mL⁻¹) determinada por cada tratamiento. Las determinaciones se hicieron por duplicado, la última columna muestra el valor de p calculado mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Se observó, además que el tratamiento realizado a una concentración de azul de metileno de 1.05 Mm presentó los mejores resultados, con una remoción de tres órdenes de magnitud, disminuyendo de 1×10^6 UFC mL⁻¹ que se tiene a la entrada hasta 1×10^3 UFC mL⁻¹ en promedio, obteniendo en uno de los casos hasta 1×10^2 UFC mL⁻¹.

Tabla 1 Cuantificación de *E. coli* enteropatógena bajo diferentes tratamientos

| Azul de metileno | Condición | <i>E. Coli</i> enteropatógena Log (UFC mL ⁻¹) | Valor de P |
|------------------|-----------|---|------------|
| Mi | SR | 6.09 | 0.003 |
| Mi | SR | 5.90 | |
| 0 | SR | 6.08 | |
| 0 | SR | 5.81 | |
| 0.85 | SR | 5.93 | |
| 0.85 | SR | 5.57 | |
| 0.95 | SR | 6.13 | |
| 0.95 | SR | 5.60 | |
| 1.05 | SR | 6.21 | |
| 1.05 | SR | 5.04 | |
| Media | | 5.8360 (± 0.35) | |
| Mi | R | 5.64 | |
| Mi | R | 5.82 | |
| 0 | R | 5.23 | |
| 0 | R | 5.41 | |
| 0.85 | R | 3.36 | |
| 0.85 | R | 3.95 | |
| 0.95 | R | 2.70 | |
| 0.95 | R | 3.65 | |
| 1.05 | R | 1.70 | |
| 1.05 | R | 3.40 | |
| Media | R | 4.0860 (± 1.38) | |

La prueba de Shapiro-Wilk reveló que la muestra tuvo un comportamiento normal ($p > 0.05$; tabla 2).

Tabla 2 Pruebas de normalidad de los tratamientos del agua

| E. coli | Cond | Shapiro-Wilk | | |
|---------|------|--------------|----|-------|
| | | Estadístico | gl | Sig. |
| | R | 0.928 | 10 | 0.428 |
| | SR | 0.881 | 10 | 0.132 |

Estos resultados demuestran el alcance de emplear este novedoso método para desinfectar el agua bajo condiciones controladas en laboratorio.

Caso 3. Fotosensibilización para la remoción de coliformes totales

Para la preparación de la solución, se utilizó AM en solución alcohólica al 1% de 500 ml de la marca LABESSA y añil. Para la medición de absorbancia se utilizó un espectrómetro de fibra óptica Ocean Optics Inc. USB4000 y el software Spectra Suite. Se utilizó la longitud de onda de 625 nm para determinar la concentración del colorante.

Influyente: El agua fue extraída de la planta de bombeo Culati, ubicada en localidad de Chiapa de Corzo, con coordenadas 16°41'35.65" N y 93°00'33.46" W. Para el primer tratamiento (azul de metileno) se colectó 10 litros y para el segundo tratamiento (añil) se colectó 20 litros de agua y se tomó una muestra en una bolsa estéril de 500 ml seguido del protocolo que establece la NMX-AA-042-SCFI-2015.

Efluente: Se colectó el agua tratada a la salida del tren de tratamiento en una bolsa estéril de 500 ml seguido del protocolo que establece en la NMX-AA-042-SCFI-2015. En ambos casos (influyente y efluente) durante el traslado de las muestras de agua al laboratorio correspondiente, se mantuvieron a una temperatura alrededor de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El primer ensayo fue realizado con un tiempo de exposición de 75 minutos, a una radiación solar promedio de 533.75 W/m^2 (datos obtenidos del Servicio Meteorológico Nacional, SMN). Se utilizó la concentración de 248.46 mg/ml de AM aplicado para la desinfección de 12 litros de agua a un caudal de $2.66 \times 10^{-6}\text{ m}^3/\text{s}$. Se determinó para el influyente un total de 24200 UFC/100 ml, mientras que para el efluente se redujo a 1680 UFC/100 ml de coliformes totales, obteniéndose una eficiencia de remoción del 93.05%. Dichos análisis fueron desarrollados por el método sustrato cromogénico.

En el segundo ensayo se utilizó añil como fotosensibilizador, a una concentración de 0.2 mg/ml , expuesto durante 65 minutos a una radiación solar de 741.18 W/m^2 . Durante ese tiempo se aplicó el tratamiento para 8.5 litros de agua, teniendo $2.17 \times 10^{-6}\text{ m}^3/\text{s}$ de caudal. Los resultados del influyente tuvieron un valor de 24000 NMP/ml de organismos de Coliformes totales (Número Más Probable). Después del tratamiento, se logró reducir hasta 3500 NMP/100 ml, obteniendo una eficiencia de remoción del 85.41%. estas mediciones se realizaron según la metodología de la NOM-112-SSA1-1994 para la determinación de bacterias Coliformes con la Técnica de Número Más Probable.

Los resultados del influyente y efluente del tratamiento se comparan al límite permisible para la ausencia o no detectable, referente a organismos Coliformes totales, establecido en la NOM-127-SSA1-1994. Aunque, la turbidez y los sólidos no se evaluaron en este estudio, cabe mencionar que en ambos tratamientos se presenciaron sólidos y después de 20 minutos se sedimentaron en el recipiente 1 y en los primeros 3 contenedores.

Conclusiones

La concentración de AM con mayor absorción se presentó en 1 mM a un flujo de energía de 5 J/cm^2 . Las pruebas realizadas a distintos volúmenes de solución, definieron que la absorbancia de energía con respecto al volumen presenta cierto límite, en el cual se puede definir que en un volumen muy bajo el medio se satura de luz lo que provoca la inhibición en la generación de reactivos de oxígeno, así como también el mismo efecto de producción se ve afectado en volúmenes elevados. Los resultados obtenidos determinaron una alta relación entre la concentración del fotosensibilizador y la energía absorbida en un determinado tiempo para la producción de los reactivos de oxígeno. Empleando la luz solar como fuente de energía, se demostró que se obtiene la inhibición de bacterias E. coli ATCC225, EPEC y coliformes totales. La inhibición de coliformes totales aplicando azul de metileno como agente sensibilizador a una longitud de onda de 620 nm-a 630 nm fue efectivo, alcanzando una reducción de 93.05%, aunque este resultado no se encuentra dentro del límite establecido por la NOM-127-SSA1-1994. Esta baja eficiencia pudo ser ocasionada por la dosis aplicada (248.46 mg/ml) del fotosensibilizador, considerada alta, en comparación a dosis que otros autores han reportado.

El empleo de un colorante natural como el añil, resultó ser efectivo como agente sensibilizador. Ya que no existe antecedente de su empleo en el tratamiento de aguas. Presentó 85.04% de remoción de organismos de Coliformes totales. Se considera que debido a que el colorante se obtiene de la planta del Xiquilete mediante procesos tradicionales, dichos procesos de producción perjudican en menor medida al medio ambiente en contraste al empleo de un colorante como el azul de metileno.

Referencias

- Bergey, D.H., and J G. Holt. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed, Baltimore Williams & Wilkins.
- Castañeda, M. (2019). El índigo en la pintura de caballete novohispana: mecanismos de deterioro. *Intervención, Revista Internacional de Conservación, Restauración y Museología*, 10(19), 25–35.
- Contreras Sánchez, A. (2014). Biodiversidad perdida: el caso de los colorantes, *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán, Uso de la flora y fauna silvestre*, 368-372.
- Cooper, A. T., & Goswami, D. Y. (2002). Evaluation of methylene blue and rose bengal for dye sensitized solar water treatment. *J. Sol. Energy Eng.*, 124(3), 305-310.
- De Paula, L., Santos, R., Menezes, H., De Britto, J., Vieira, J., Gontijo, P., & De Oliveiraa, C. (2010). A comparative study of irradiation systems for photoinactivation of microorganisms. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(4), 694–700.
- Fekrazad, R., Zare, H., & Vand, S. M. S. (2016). Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by Radachlorin and toluidine blue O on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 15, 213–217.
- García, D. (2010). Generación fotosensibilizada de oxígeno singlete. *Tecnia*, 20(1), 5–11.
- Gutiérrez, C., Robles, L., Ortiz, F., & Martínez, L. (2006). Desinfección fotocatalítica del agua para consumo humano usando luz solar y dióxido de titanio (TiO₂) inmovilizado. *Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental*.
- Hanan, A. M., & Mondragón, J. (2009). *Indigofera suffruticosa*. Ficha Informativa: CONABIO.
- Hasegawa, G., Lopes, J., Soares, M., & Freitas, A. (2015). Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by methylene blue and malachite green under red LED light. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), 445–458.
- Martínez, S. I. (2014). Azul maya un colorante natural. *La Ciencia y El Hombre*, 27(1), 40–42.
- Orellana, G., Villén, L., & Emilia, M. (2011). Desinfección mediante fotosensibilizadores: principios básicos. *Solar Safe Water*, 15(sección 4), 243– 258.
- Rossel, L., Ferro, F., Ferro, A. L., & Zapana, R. (2020). Radiación ultravioleta-c para desinfección bacteriana (coliformes totales y termotolerantes) en el tratamiento de agua potable. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 22(1), 68–77.
- Sabbahi, S., Alouini, Z., Ben, L., & Jemli, M. (2010). Inactivation of faecal bacteria in wastewater by methylene blue and visible light. *Desalination and Water Treatment*, 20, 209–219.
- Sandoval, F., Gschaedler, A., Vilarem, G., & Méndez, C. (2006). Efecto del tiempo 74 de cosecha sobre la producción de colorantes en *Indigofera suffruticosa* Mill. *Agrociencia*, 40(5), 585–591.
- Solarte, Y., Salas, M. L., Sommer, B., Dierolf, C., & Wegelin, M. (1997). Uso de la radiación solar (UV-A y temperatura) en la inactivación del *Vibrio Cholerae* en agua para consumo humano. Factores que condicionan la eficiencia del proceso. *ColombiaMédica*, 28(3), 109–112.
- Vidal-Graniél, Jorge E. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil *Salud en Tabasco*, vol. 9, núm. 1, abril, 2003, pp. 188-193.